文章编号:1000-5404(2006)12-1295-03

论著

γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞SHP-1 mRNA及蛋白表达变化的研究

黄定德[1],陈 杞[2],韩 玲[2],蔡建明[2] ([1]第三军医大学西南医院核医学科,重庆 400038;[2]第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433)

提 要:目的 探讨蛋白酪氨酸磷酸酶SHP-1 mRNA及蛋白表达在γ射线体外诱发的白血病小鼠骨髓细胞中的变化情况。**方法** 实验分为白血病组、辐射未癌变组及对照组,应用荧光定量PCR法及Western blot法分别检测各组骨髓有核细胞中SHP-1 mRNA及蛋白表达的变化情况。**结果** 白血病组SHP-1 mRNA含量为(5.26±2.14),明显高于辐射未癌变组(3.68±1.27)及对照组(2.95±1.09),($P<0.01$);白血病组SHP-1蛋白表达量(光密度)为(5.378±2.905),明显高于对照组(1.852±0.711)及辐射未癌变组(1.559±0.506)。**结论** 在γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中,SHP-1 mRNA含量及蛋白表达量均明显增强。

关键词:辐射致癌;信号转导;SHP-1;小鼠;白血病
中图法分类号:R329.26;R331.22;R733.7 **文献标识码**:A

Changes of SHP-1 mRNA and protein of bone marrow cells of mice with leukemia induced by γ-ray irradiation

HUANG Ding-de[1], CHEN Qi[2], HAN Ling[2], CAI Jian-ming[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Radiological Medicine, College of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate alteration of SHP-1 mRNA and protein of bone marrow cells of leukemia mice after γ-ray exposure. **Methods** A total of 318 BALB/c mice were exposed to ^{60}Co γ-ray once a week for 4 weeks, and the total dose of γ-ray received by mice was 7.00 Gy. By pathological examination, 39 mice developed thymic lymphoma, 14 acute lymphocytic leukemia, 21 T-lymphoblast leukemia/lymphoma, 1 spiroma, 4 malignant yolk sac tumor. Exposed to γ-ray, the mice that developed leukemia or were free of canceration were used in our study ($n=10$ in each group), and another 10 mice free from irradiation served as control. SHP-1 mRNA and protein in femoral bone marrow cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and Western blotting respectively. **Results** SHP-1 mRNA in leukemia mice was (5.26±2.14), significantly higher than that of mice free of canceration (3.68±1.27) and controls (2.95±1.09) ($P<0.01$). SHP-1 protein in leukemia mice [optical density (5.378±2.905)] was significantly higher than that in mice free of canceration [optical density (1.559±0.506)] and controls [optical density (1.852±0.711)]. **Conclusion** SHP-1 mRNA and protein were significantly increased in bone marrow cells of leukemia mice induced by γ-ray irradiation.

Key words: radiation carcinogenesis; signal transduction; SHP-1; BALB/c mouse; leukaemia

辐射致癌的机制为当今研究的热点,可能涉及癌基因的激活与抑癌基因失活、细胞周期调控基因改变及信号转导途径的失控等复杂的机制[1]。本课题组以往的研究成功地复制了γ射线体外诱发BALB/c小鼠白血病模型[2],并发现:在γ射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中,含SH2域的酪氨酸磷酸酶1(Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 1, SHP-1)的翻译异常,表现为翻译增强现象。本研究进一步探讨了在γ射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中SHP-1 mRNA及蛋白表达的变化情况。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170282)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170282)
作者简介:黄定德(1970-),男,湖南省耒阳市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤的分子核医学方面的研究,发表论文9篇,电话:(023)68752320
收稿日期:2005-08-31;**修回日期**:2005-09-15

1 材料与方法

1.1 辐射致癌动物模型的复制、分组

参考文献[2],318 只 BALB/c 小鼠,^{60}Co γ 射线分次全身照射后,经病理学证实有胸腺淋巴瘤(39 只)、急性淋巴细胞型白血病(14 只)、前 T 细胞淋巴母细胞白血病/淋巴瘤(21 只)、汗腺瘤(1 只)、恶性卵黄瘤(4 只)。其中发生白血病者为白血病组、未发生癌变者为辐射未癌变组,另设未经 γ 射线照射的对照组。每组小鼠 10 只。

1.2 骨髓细胞的获取

常规方法获取小鼠双侧股骨骨髓有核细胞,分成 3 份:1 份涂片行病理学检查;1 份用于提取总 RNA;1 份用于提取总蛋白质。

1.3 实时荧光定量 PCR 法检测 SHP-1 mRNA 含量

1.3.1 骨髓细胞总 RNA 的提取 用 Trizol 一步法试剂盒(购自上海华舜生物公司)提取骨髓细胞总 RNA,-70 ℃保存备用。

1.3.2 mRNA 的逆转录 参照 MmuLV RT-PCR 试剂盒(上海申能博彩生物公司产品)说明书进行,得 cDNA。

1.3.3 PCR 引物设计 Taqman 荧光探针根据仪器要求选择 FAM 作为荧光报告基团,MGB 作为淬灭基团。小鼠 SHP-1 基因的上游引物序列 5′-TCAACCAGCGACAGGAAAGTT-3′,下游引物 5′-GCGCTGCAATGCACAATG-3′,退火温度 60 ℃,产物长为 57 bp,Taqman 探针序列为 FAM-CTCATGCAGGGCCCA-MGB;小鼠 β-actin 基因的上游引物 5′-AGGCCAACCGTGAAAAGATG-3′,下游引物 5′-GCCTGGATGGCTACGTACATG-3′,退火温度 60 ℃,产物长 75 bp,β-actin 基因的 Taqman 探针序列为 FAM-CCCAGATCATGTTTGAGAC-MGB。引物及探针的设计、合成、标记由上海 genecore 公司进行,经登录 NCBI 网站进行 blast 分析,证实该引物和探针的特异性很强,与别的基因和 EST 片段无同源性。

1.3.4 荧光定量 PCR 反应 参照文献[3]方法进行,对 mRNA 进行定量分析。

1.4 Western blot 法检测骨髓细胞 SHP-1 蛋白表达

细胞总蛋白的提取参照文献[4]方法进行,一抗为抗 SHP-1 的单克隆抗体(Santa Cruz 公司,1∶800),二抗为 anti-mouse IgG-HRP(Santa Cruz 公司,1∶600),ECL 发光试剂盒购自上海普飞生物技术公司。以 β-actin 为内参照,结果经 SmartView2001 生物电泳图像分析软件(上海复日科技有限公司)进行半定量分析。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计学软件 SPSS 10.0 行单因素方差分析。

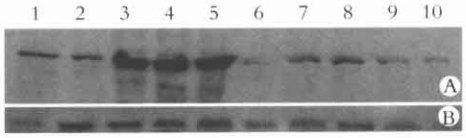
2 结果

2.1 白血病小鼠骨髓细胞中 SHP-1 mRNA 含量的变化

以标准品浓度的对数为横坐标,Ct 值为纵坐标作图,二者的相关系数达到了 1.00,即 Ct(阈循环,Threshold cycle)值与 mRNA 含量的相关性非常好,说明用此定量结果可靠,回归方程为 Ct = 43.31 - 3.126 lg [mRNA 含量],以此回归方程为基础,对各组小鼠骨髓细胞 SHP-1 mRNA 定量,结果经内参照 β-actin 校正,白血病组、辐射未癌变组及对照组分别为(5.26 ± 2.14)、(3.68 ± 1.27)、(2.95 ± 1.09),(n = 10),白血病组明显高于辐射未癌变组及对照组(P < 0.01)。

2.2 白血病小鼠骨髓细胞中 SHP-1 蛋白表达量的变化

经 Western blot 分析,以密度定量的光密度值反映,发现白血病组骨髓细胞中 SHP-1 的蛋白表达水平(5.378 ± 2.905),(n = 10)明显高于对照组(1.852 ± 0.711),(n = 6)及非癌变组(1.559 ± 0.506),(n = 8),(P < 0.01),而辐射未癌变组及对照组间差异无显著性(P > 0.05),与 mRNA 含量的变化趋势一致,见图 1。



A: SHP-1; B: β-actin. 1-5: 白血病组; 6-8: 对照组; 9, 10: 辐射未癌变组

图 1 SHP-1 蛋白在 γ 射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中的表达

3 讨论

酪氨酸磷酸酶的去磷酸化作用与酪氨酸激酶的磷酸化作用共同调节细胞内蛋白质的酪氨酸磷酸化水平,与细胞生长、分化、信号转导、细胞周期调控等有密切的联系。SHP-1 是天然存在于细胞质中的一种酪氨酸磷酸酶,其发挥作用的基本模式是:细胞因子等外来信号与其受体结合后引起受体分子的二聚化,使得与受体耦联的 JAK 激酶相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化而活化,活化的 JAK 催化受体本身的酪氨酸磷酸化,同时也形成了磷酸酶 SHP-1 的停靠位点。一旦停靠在该位点,SHP-1 就会催化 JAKs 或其他酪氨酸激酶(如 *Src*、*c-fms* 等)的酪氨酸去磷酸化,降低这些激酶的催化活性,从而终止信号转导,起负性调控作用,抑制细胞增殖[5]。另有报道,当细胞受到 γ 线辐照时,SHP-1 通过 Bax 途径及通过调控细胞周期而诱导细胞凋亡[6]。Zhang 等[7]对部分 T 淋巴瘤细胞系,Oka 等[8]对多种淋巴瘤、白血病细胞系进行了研究,发现 SHP-1 在大多数淋巴瘤、白血病细胞系中缺乏表达(但在少数细胞系中表达无明显变化,甚至在个别细胞系中表达增强),并且认为 SHP-1 缺乏表达可能是由于 SHP-1 启动子的甲基化而诱导,这些事实说明 SHP-1 在淋巴瘤多步瘤变机制中发挥重要作用,与肿瘤的形成及生长呈负相关,可能是一个潜在的抑癌基因[9]。

但本研究提示 γ 射线诱发的白血病小鼠骨髓细胞中 SHP-1 的 mRNA 含量及其蛋白表达量的变化趋势一致,均明显高于对照组及辐射未癌变组,即在骨

髓肿瘤细胞中 SHP-1 的基因及蛋白表达明显增强，似与预想结果不符，可能的原因是：①因 SHP-1 对肿瘤的生长起抑制作用，所以白血病组 SHP-1 mRNA 及蛋白表达的升高是负反馈调节作用；②SHP-1 蛋白发挥功能的前提是其自身首先被磷酸化而激活，激活后的 SHP-1 使 JAK2 等信号分子去磷酸化，通过抑制信号分子的活性而抑制肿瘤的生长。SHP-1 的基因及蛋白表达虽然升高，但它使激活的信号分子（如 JAK2 等）去磷酸化的功能减弱或丧失，即 SHP-1 蛋白可能存在功能缺陷，出现蛋白表达与生物效应分离现象。我们此前的研究提示在白血病组胸腺细胞中存在这种现象，是否在骨髓细胞中也是如此尚需在以后的实验中进一步证实。

本课题组以往的研究提示，γ 射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中 SHP-1 mRNA 含量无明显变化，而其蛋白表达量却明显增强，即在白血病小鼠胸腺细胞中存在 SHP-1 mRNA 的翻译异常，表现为翻译增强现象，γ 射线可能通过调控 SHP-1 mRNA 的翻译水平来调控 SHP-1 蛋白的表达，从而对辐射致癌起一定的促进作用。但本研究显示在骨髓细胞中 mRNA 含量及其蛋白表达量的变化趋势一致，并无翻译障碍现象。白血病组胸腺细胞与骨髓细胞中存在此种差别的机制尚需进一步研究。

参考文献：

[1] 李　刚，吴德昌. 肿瘤相关基因突变是辐射致癌的主要分子事件[J]. 中华放射医学与防护杂志，1998，18(3)：214－216.

[2] 韩　玲，蔡建明，李百龙，等. ^{60}Coγ 射线照射诱发小鼠恶性肿瘤[J]. 第二军医大学学报，2003，24(7)：745－748.

[3] 黄定德，陈　杞，韩　玲，等. γ 线诱发的白血病小鼠胸腺细胞 SHP-2 mRNA 变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(20)：1809－1811.

[4] SHARLOW E R, PACIFICI R, CROUSE J, *et al*. Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced hemoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells[J]. Blood, 1997, 90(6): 2175－2187.

[5] CHIANG G G, SEFTON B M. Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 23173－23178.

[6] HSU H C, SHULTZ L D, SU X, *et al*. Mutation of the hematopoietic cell phosphatase (Hcph) gene is associated with resistance to gamma-irradiation-induced apoptosis in Src homology protein tyrosine phosphatase (SHP)-1-deficient "Motheaten" mutant mice[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 772－780.

[7] ZHANG Q, RAGHUNATH P N, VONDERHEID E, *et al*. Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter[J]. Am J Pathol, 2000, 157(4): 1137－1146.

[8] OKA T, YOSHINO T, HAYASHI K, *et al*. Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias: combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray[J]. Am J Pathol, 2001, 159(4): 1495－1505.

[9] OKA T, OUCHIDA M, KOYAMA M, *et al*. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6390－6394.

（编辑　陈聪连）

《现代美容整形外科学》征订启事

由军内外著名美容整形外科专家、第三军医大学西南医院教授领衔主编、国内外数十名经验丰富的美容整形外科专家和学者编撰，系统阐述了以常见经典手术为主的各类美容整形外科手术的基本原则及操作技术等最新知识的专著《现代美容整形外科学》于 2006 年 4 月由人民军医出版社出版，全国发行。本书特点：(1) 70 余位美容整形专家鼎力奉献，中韩 13 位著名权威专家主编、审定。(2) 系统介绍了头颅、颈颈、面颈、牙颌、五官、胸壁、乳房、四肢、会阴、生殖器等各部位的美容整形手术的适应证、禁忌证、术前准备、麻醉与体位、手术步骤、术中注意要点、术后注意事项、术后处理以及并发症等都进行了详细阐述，并配有大量精细的局部解剖和手术操作示意图或照片。全面阐述了美容整形、显微外科、创伤美容、麻醉、皮肤色斑及体表肿瘤、皮肤软组织扩张、吸脂减肥、组织移植、生物材料、组织工程、瘢痕的预防和治疗的最新知识和冷冻、文刺、计算机、内镜、超声、光子、纳米、激光等技术在美容整形外科的应用。根据当今美容整形外科的发展特点，特别加入了人体美学、心理学、康复医学以及医学美容法规及医疗纠纷的防范等内容。(3) 全书共计 1848 页，插图 1160 余幅，其中彩色插图 80 余幅。正 16 开，80 g 双面铜版纸彩色印刷。豪华精装加封面套盒。定价：680 元/册。

本书作者在参阅国内外大量最新文献的基础上，较全面地反映了美容整形外科学的发展水平。《现代美容整形外科学》是一部系统、全面介绍美容整形外科技术的专著，是从事美容整形外科的工作人员案头必备参考书，是各级各类美容整形医疗单位、医学院校师生、图书馆、资料室重点收藏图书。

地　址：重庆市高滩岩第三军医大学学报编辑部　　邮　编：400038

联系人：王　红　　电　话：(023)68752782，68752189－84